[食品検査用]

2013年11月作成（第1版）
*2014年 3 月作成（第2版）

FASTKIT エライザ Ver. Ⅲ 卵
取扱説明書

※本製品をご使用になる前に必ずお読みください。

開発の経緯及び特徴*

本製品は平成22年9月10日付け消食表第286号消費者庁次長通知「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」で示されたガイドラインに準拠したキットで、食品中に含まれる卵由来の複数のタンパク質を、原材料から加工食品まで幅広く測定できます。
また、平成26年3月26日付け消食表第36号消費者庁次長通知「「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」の一部改正について」に従い、従来のFASTKIT エライザ Ver. Ⅱ卵から毒物である2-メルカプトエタノールを除去しております。よって、一般試薬と同様に保管・廃棄が可能です。なお、消食表第36号消費者庁次長通知 別添6「アレルギー物質を含む食品の検査方法の改良法の評価に関するガイドライン」に従い、従来法と同等の性能であることを確認しています。

目的・性能

・食品中に含まれる卵タンパク質の測定
・溶液中の標準卵タンパク質を0.78 ~ 50ng/mLの範囲で測定可能

キットの内容

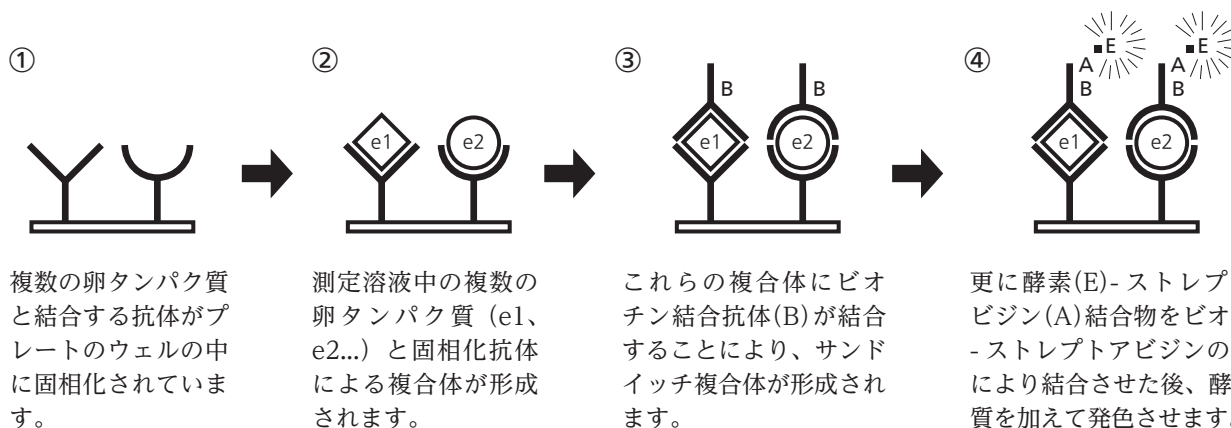
Ⓐ 抗体固相化プレート（カバー付き）
…………………… 96ウェル（8ウェル× 12列）× 1枚
Ⓑ 標準溶液（50ng/mL）……………………… 1.8mL × 1本
Ⓒ 希釈用緩衝液 ……………………………… 100mL × 1本
Ⓓ ビオチン結合抗体 ………………………… 150µL × 1本
Ⓔ 酵素（ペルオキシダーゼ）- ストレプトアビジン結合物
……………………………………………… 150µL × 1本
Ⓕ 発色剤 ……………………………12mL × 1本
Ⓖ 反応停止液（0.5N 硫酸）…………12mL × 1本
Ⓗ 濃縮洗浄液（10倍濃縮）……… 100mL × 1本
Ⓘ 抽出用試薬①（20倍濃縮）………50mL × 1本
Ⓙ 抽出用試薬②（20倍濃縮）………50mL × 1本
Ⓚ 抽出用試薬③（20倍濃縮）………50mL × 1本
Ⓛ 取扱説明書 ……………………………… 1部

測定原理

① 複数の卵タンパク質と結合する抗体がプレートのウェルの中に固相化されています。

② 測定溶液中の複数の卵タンパク質（e1、e2...）と固相化抗体による複合体が形成されます。

③ これらの複合体にビオチン結合抗体(B)が結合することにより、サンドイッチ複合体が形成されます。

④ 更に酵素(E)-ストレプトアビジン(A)結合物をビオチン-ストレプトアビジンの反応により結合させた後、酵素基質を加えて発色させます。

必要な機器

試薬の調製

・メスシリンダー、ビーカー、マイクロピペット、チップ　等

測定溶液の調製

・粉砕機（フードカッター）、秤、50mL容量プラスチック製遠沈管（キャップ付）、振とう機、遠心分離機（3,000 × g以上、室温での遠心分離可能なものを推奨）、ろ紙、漏斗　等

測定操作およびデータ解析

・マイクロピペット、チップ、試験管もしくはマイクロチューブ、吸収紙（ペーパータオル）、マイクロプレートリーダー（波長450nmおよび600 ~ 650nmのフィルターがセットされたもの）、解析ソフト（4係数Logistic解析が可能なもの）　等

注1）器具類を介したコンタミネーションが生じる可能性があるため、可能な限りディスポーザブルの器具もしくは専有化した器具を使用してください。洗浄して使用する場合には、アルカリ洗剤を用いて確実にタンパク質を除去してください。

試薬の調製

そのまま使用する試薬

・希釈用緩衝液：室温（20 ~ 25℃）に戻して使用してください。
・発色剤：必要量を遮光容器に分注し、室温（20 ~ 25℃）に戻して使用してください。
・反応停止液：室温（20 ~ 25℃）に戻して使用してください。

調製して使用する試薬

・検体抽出液：抽出用試薬①、抽出用試薬②、抽出用試薬③および精製水を 1:1:1:17 の割合で混合し、よく攪拌した後使用してください。
・標準品希釈液：検体抽出液を希釈用緩衝液にて、20 倍に希釈してください。
・標準溶液：下記の希釈例を参考に、標準品希釈液を用いて希釈してください。

検体抽出液調製例：24 検体分調製する場合

抽出用試薬①（20 倍濃縮）	：25mL
抽出用試薬②（20 倍濃縮）	：25mL
抽出用試薬③（20 倍濃縮）	：25mL
精製水	：425mL
合計	：500mL

標準溶液の希釈例

標準品濃度（ng/mL）	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.78125	0
標準溶液添加量（µL）	800	400	400	400	400	400	400	0
標準品希釈液添加量（µL）	0	400	400	400	400	400	400	400

・濃縮洗浄液：精製水にて 10 倍希釈して使用してください。
・ビオチン結合抗体：あらかじめ室温に戻した希釈用緩衝液を用いて 100 倍希釈し、15 分以内に使用してください。
・酵素 - ストレプトアビジン結合物：あらかじめ室温に戻した希釈用緩衝液を用いて 100 倍希釈し、15 分以内に使用してください。

使用する希釈液および希釈対象

希釈対象	標準溶液	抽出後の上清もしくはろ液	ビオチン結合抗体	酵素 - ストレプトアビジン結合物
希釈用緩衝液		○	○	○
標準品希釈液	○			

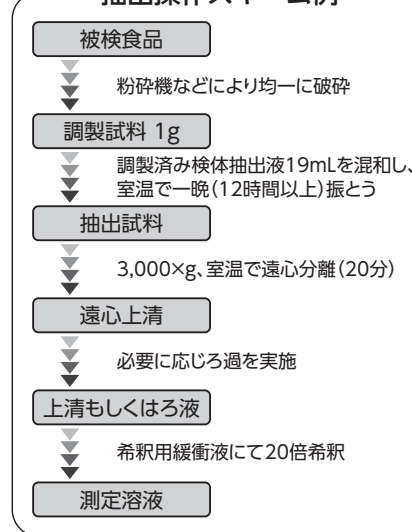
注1）標準溶液、ビオチン結合抗体、および酵素 - ストレプトアビジン結合物は使用直前まで冷蔵保存し、使用後は直ちに冷蔵保存してください。
注2）ロット番号の異なる試薬を混合、もしくは差し替えて使用しないでください。
注3）ラベルに測定項目が記載されている試薬（抗体固相化プレート、標準溶液、ビオチン結合抗体、酵素 - ストレプトアビジン結合物）は他の測定項目に使用しないでください。ただし、測定項目の記載がない試薬は全ての測定項目でご使用いただけます。
注4）抽出用試薬②・③は保管・流通時に沈殿を生じますが、性能上問題ありません。湯煎等で加温融解して使用してください。

抽出操作（一般的な食品における操作例）

1）被検食品（検体）を一包装単位毎に粉砕機などにより均一な状態に粉砕したものを調製試料とします。
2）調製試料 1g をプラスチック製遠沈管に量りとり、検体抽出液 19mL を加えよく混合し、固形分を均等に分散します（注 1）。
3）振とう機に遠沈管を横にして置き、室温で一晩（12 時間以上）振とうしたものを抽出試料とします（注 2)（注 3)。
4）抽出試料を 3,000 × g，室温で 20 分間遠心分離し、分離された上清を回収、もしくは沈渣が得られない場合にはろ過を行ってください（注 4)。
5）回収した上清もしくはろ液を希釈用緩衝液で 20 倍希釈したものを測定溶液とします。

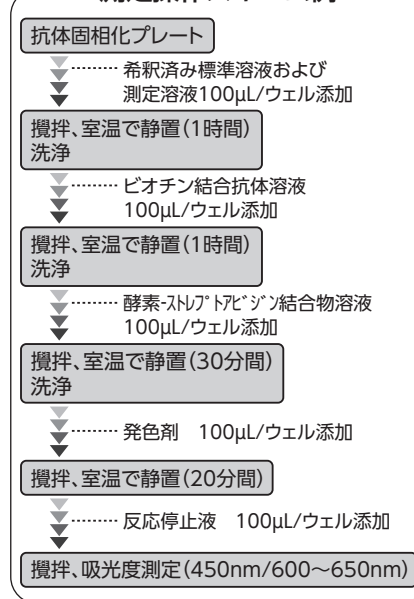
注1）調製試料を分散させる際には、あまり泡立たせないよう注意しながらボルテックスミキサーなどを用いて十分に分散させてください。
注2）振とう回数は 1 分間に 90 ～ 110 往復程度、振とう幅は 3 ｃm程度として、振とうにより液が遠沈管の両端に打ち付けられるように調整してください。また、液面に沿って付着する調製試料を分散させるため、時々遠沈管の上下を入れ替えるなどの操作をしてください。
注3）抽出試料の pH を確認し、必要であれば、中性付近（pH6.0 ～ 8.0）となるように調整してください。
注4）回収する上清の量はなるべく一定とし、可能であれば油層を除去してください。また、正確な結果を得るためにろ過を行うことを推奨します。

抽出操作スキーム例

被検食品
↓ 粉砕機などにより均一に破砕
調製試料 1g
↓ 調製済み検体抽出液19mLを混和し、室温で一晩（12時間以上）振とう
抽出試料
↓ 3,000×g、室温で遠心分離（20分）
遠心上清
↓ 必要に応じろ過を実施
上清もしくはろ液
↓ 希釈用緩衝液にて20倍希釈
測定溶液

測定操作

1） 抗体固相化プレートをアルミパウチ袋に入れたまま室温に戻し、使用直前にアルミパウチ袋から取り出してください（注1）。
2） 各ウェルに希釈した標準溶液および測定溶液 100μL を加えてください（注2）。
3） 軽く攪拌した後、室温（20 ～ 25℃）で、1 時間静置して反応させてください。
4） 反応終了後、標準溶液および測定溶液を捨て、各ウェルにあらかじめ希釈した洗浄液 250μL を加え、これを捨てる操作を 5 回繰り返してください（注3）。
5） 各ウェルに調製したビオチン結合抗体溶液 100μL を加えてください。
6） 軽く攪拌した後、室温（20 ～ 25℃）で、1 時間静置して反応させてください。
7） 反応終了後、ビオチン結合抗体溶液を捨て、手順 4）と同様に洗浄してください。
8） 各ウェルに調製した酵素 - ストレプトアビジン結合物溶液 100μL を加えてください。
9） 軽く攪拌した後、室温（20 ～ 25℃）で、30 分間静置して反応させてください。
10） 反応終了後、酵素 - ストレプトアビジン結合物溶液を捨て、手順 4）と同様に洗浄してください。
11） 各ウェルにあらかじめ室温に戻した発色剤 100μL を加えてください。
12） 軽く攪拌した後、室温（20 ～ 25℃）で、20 分間静置して発色させてください。データの再現性を高めるため、遮光条件下での発色を推奨します。
13） 各ウェルにあらかじめ室温に戻した反応停止液 100μL を加え、軽く攪拌して発色を停止してください（注4）。
14） 攪拌後、プレートリーダーにて主波長 450nm、副波長 600 ～ 650nm の吸光度を測定してください。

測定操作スキーム例

抗体固相化プレート
↓ ……… 希釈済み標準溶液および測定溶液100μL/ウェル添加
攪拌、室温で静置（1時間）
洗浄
↓ ……… ビオチン結合抗体溶液 100μL/ウェル添加
攪拌、室温で静置（1時間）
洗浄
↓ ……… 酵素-ｽﾄﾚﾌﾟﾄｱﾋﾞｼﾞﾝ結合物溶液 100μL/ウェル添加
攪拌、室温で静置（30分間）
洗浄
↓ ……… 発色剤　100μL/ウェル添加
攪拌、室温で静置（20分間）
↓ ……… 反応停止液　100μL/ウェル添加
攪拌、吸光度測定（450nm/600～650nm）

注1）プレートを分割して使用する場合は、使用しないストリップを必ず乾燥剤入りのアルミパウチ袋に戻し、冷蔵保存してください。
注2）標準溶液および測定溶液の測定には各 3 ウェルずつ使用することを推奨します。また、標準溶液による標準曲線は測定毎に必ず作成してください。
注3）正確な測定を行うために洗浄操作は非常に重要です。プレートを逆さにしてペーパータオルなどの上で数回強く叩きつけるなどの水切りを行いウェルに残った液と気泡を完全に除去した後、速やかに次の試薬を加えてください。
注4）反応停止液は、0.5N 硫酸を使用しています。取り扱いの際には十分注意してください。

データ解析

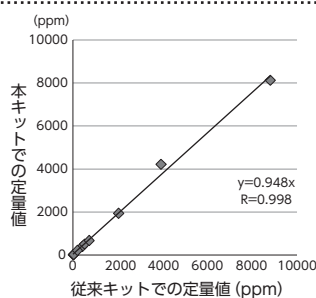
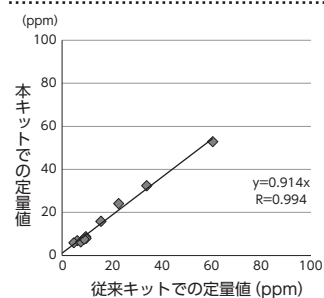
1） 標準溶液を測定して得られた吸光度から 4 係数 Logistic 解析（4- パラメーター解析）を用いて標準曲線グラフを作成します（注 1）。
2） 作成した標準曲線から、測定溶液中の卵タンパク質濃度（ng/mL）を読み取ります。
3） 読み取った卵タンパク質濃度に抽出操作時の希釈倍率（400 倍）を乗じて食品中の卵タンパク質濃度を算出します。

注 1）4- 係数 Logistic 解析以外の解析方法により、標準曲線グラフを作成したとき、測定結果が異なる場合があります。

FASTKIT エライザ Ver. Ⅱとの相関性*

複数の食品検体中の卵タンパク質を従来キット（FASTKIT エライザ Ver. Ⅱ卵）と本キットで定量した。従来キットによる定量値を X 軸に、本キットによる定量値を Y 軸にとり、その相関をプロットした。
その結果得られた相関を示す傾きおよび相関係数ともに「アレルギー物質を含む食品の検査方法の改良法の評価に関するガイドライン」に示された基準値（傾き：0.75-1.25，相関係数：R=0.9 以上）を満たしたものであった。

食品検体一覧

10,000ppm以下	100ppm以下
パン1	米菓子
パン2	菓子1
クッキー1	菓子2
クッキー2	クッキー4
クッキー3	かまぼこ
クッキー4	コーヒーゼリー
菓子1	ソーセージ
米菓子	おしるこ
練り製品	白かゆ
麺	イチゴジャム

FASTKIT エライザ Ver. Ⅱ卵バリデーション結果は日本ハム㈱中央研究所ホームページ上で公開しております。

偽陽性・偽陰性

1）卵以外の特定原材料（牛乳、小麦、そば、落花生、えび、かに）との交差反応性は認められません。
2）当社での試験の結果、偽陽性、偽陰性を示す食品が確認されています。詳細については、日本ハム㈱中央研究所ホームページにて公開している「偽陽性・偽陰性を示す食品一覧」をご参照ください。
3）非常に高濃度のタンパク質存在下では、非特異的な反応が起こる可能性があります。この場合、適当な濃度に希釈して測定を行ってください。ただし、20倍に希釈済みの測定溶液を更に希釈する際には、必ず標準品希釈液を使用してください。
4）卵加水分解物は、製造の過程で分解されているため、偽陰性を示す可能性があります。

使用上または取り扱い上の注意*

一般的な注意事項

1）この取扱説明書をよく読み、記載された操作方法に従って使用してください。
2）使用期限の過ぎたキットおよび構成品は使用しないでください。使用期限は、外箱および各構成品ラベルに記載されています。
3）本キットは食品中の特定原材料を測定するための試薬であり、食物アレルギー発症の有無を診断する試薬ではありません。本キットによる測定結果とアレルギー症状の発症との相関性については確認されていません。
4）特定原材料の有無については本キットの結果だけでなく、原材料や製造記録の確認等、他の方法と併せて総合的に判断してください。
5）本キットによる測定に使用する機械・器具類の使用方法等については、それぞれの製造元もしくは販売元にご確認ください。
6）本取扱説明書は消費者庁次長通知「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」に準拠し、検査担当者のガイドラインとして作成されています。各検査手順や各々の食品におけるアプリケーションの妥当性については自ら検証してください。
7）本キットにより得られた結果の判断および利用は、お客様の責任の下実施してください。また、その結果生じた損害および損失については、当社は責任を負いかねることをご了承ください。
8）商品の仕様については、予告なく変更になる場合があります。

危険防止上の注意事項

1）本キットの試薬類が、皮膚、粘膜、衣類等に付着しないよう注意してください。
2）誤って試薬が目や口に入った場合には、直ちに水道水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、医師の手当てを受けてください。

保存方法・使用期限

1）保存方法：冷蔵（2 ～ 8℃）、遮光にて保存してください（凍結厳禁）。
2）使用期限：製造日より 6 ヶ月。外箱および各構成品ラベルに記載されています。

参考文献*

1）消食表第 286 号消費者庁次長通知「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」
2）丸井英二：食品衛生研究 ,Vol.52(5),p25-31,2002
3）穐山浩 , 豊田正武：食品衛生研究 , Vol.52(6),p65-73,2002
4）消食表第 36 号消費者庁次長通知「「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」の一部改正について」

〔販売元および問い合わせ先〕

外箱側面に記載

〔製造元〕

日 本 ハ ム 株 式 会 社　中 央 研 究 所
〒 300-2646　茨 城 県 つ く ば 市 緑 ヶ 原 3-3
電 話：029(847)7825 ／ FAX：029(848)1256
URL：http://www.rdc.nipponham.co.jp